

(19)日本国特許庁 (JP)

## (12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-38773

(43)公開日 平成6年(1994)2月15日

|   |             |                              |                               |                  |
|---|-------------|------------------------------|-------------------------------|------------------|
| (51)Int.Cl. <sup>5</sup><br>C 12 N 15/85<br>5/10<br>15/12 | 識別記号<br>ZNA | 庁内整理番号<br>8931-4B<br>9281-4B | F I<br>C 12 N 15/ 00<br>5/ 00 | 技術表示箇所<br>A<br>B |
|---|-------------|------------------------------|-------------------------------|------------------|

審査請求 未請求 請求項の数 9(全 7 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平4-45939

(22)出願日 平成4年(1992)1月31日

特許法第30条第1項適用申請有り 平成3年8月25日  
社団法人日本生化学会発行の「第64回日本生化学大会発表抄録集」に発表

(71)出願人 000003160  
東洋紡績株式会社  
大阪府大阪市北区堂島浜2丁目2番8号

(72)発明者 富山 朔二  
京都市上京区中立売室町三丁目室町スカイ  
ハイツ107号

(72)発明者 宗川 吉汪  
京都市左京区岡崎延円勝寺町140

(72)発明者 濱田 和成  
京都市左京区松ヶ崎三反長町16番 松ヶ崎  
荘2-A

(72)発明者 吉岡 拓也  
枚方市楠葉朝日2-16-5

(54)【発明の名称】 薬剤耐性構造タンパク質遺伝子を選択遺伝子として用いた発現ベクター

(57)【要約】

【目的】 動物細胞を宿主として有用タンパク質を大量に発現させる方法を提供する。

【構成】 所望タンパク質をコードする外来の遺伝子が強力なプロモーターのコントロール下に置かれており、その下流にはターミネーター配列を外来遺伝子発現用の制御配列として有し、これとユニットでタンデムに並んでいる同様のプロモーター及びターミネーター配列の間には、薬剤耐性構造タンパク質をコードする遺伝子配列を含み、かつ不完全チミジンキナーゼ遺伝子配列を有することを特徴とする発現ベクター。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 薬剤耐性構造タンパク質をコードする遺伝子を選択遺伝子として含む発現ベクター。

【請求項2】 請求項1記載の発現ベクターにおいて、所望タンパク質をコードする外来の遺伝子が強力なプロモーターのコントロール下に置かれており、その下流にはターミネーター配列を外来遺伝子発現用の制御配列として有し、これとユニットでタンデムに並んでいる同様のプロモーター及びターミネーター配列の間には、薬剤耐性構造タンパク質をコードする遺伝子配列を含み、かつ不完全チミジンキナーゼ遺伝子配列を有することを特徴とする発現ベクター。

【請求項3】 薬剤耐性構造タンパク質をコードする遺伝子が薬剤耐性アクチン遺伝子由来の遺伝子である請求項1又請求項2記載の発現ベクター。

【請求項4】 薬剤耐性アクチン遺伝子が変異型ヒト $\beta$ -アクチン( $\beta'$ -アクチン)由来の遺伝子である請求項3記載の発現ベクター。

【請求項5】 薬剤がサイトカラシンBである請求項2記載の発現ベクター。

【請求項6】 強力なプロモーターがSV40プロモーターである請求項2記載の発現ベクター。

【請求項7】 請求項1～6のいずれかに記載の発現ベクターを用い、この発現ベクターのプロモータ下流に外来構造遺伝子を組み込んだ組換えプラスミドにより、ヒトチミジンキナーゼ欠損細胞を形質転換することを特徴とする形質転換方法。

【請求項8】 ヒトチミジンキナーゼ欠損細胞が、KB細胞である請求項7記載の形質転換方法。

【請求項9】 所望タンパク質をコードする外来構造遺伝子を発現させる方法において、請求項7又は8記載の形質転換方法を用いて形質転換した細胞を培養することを特徴とする所望タンパク質の大量発現方法。

## 【発明の詳細な説明】

### 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、動物細胞における有用タンパク質をコードする遺伝子の大量発現に有用な、新規なプラスミドベクターに関するものである。

### 【0002】

【従来の技術】 遺伝子組換え技術の進歩に伴って、遺伝子組換えを利用した有用物質の生産技術は近年急速に進歩してきている。遺伝子組換え技術を利用して外来遺伝子を発現させる場合には、適当な宿主細胞と、これに応じた外来遺伝子発現用プロモーター及び選択マーカーを有するベクターが用いられる。これまでには、大腸菌や酵母等、取扱いが容易な微生物が発現の宿主細胞として広く研究されてきたが、この様な微生物では外来遺伝子の発現において一部に限界があることが確認されており、また、人体へ投与する薬剤タンパクの発現については、微生物よりも動物細胞を用いることが好ましいとさ

れ、近年では高等動物培養細胞等の動物細胞を発現宿主とした発現系が盛んに研究されてきている。

【0003】 これまでに知られている動物細胞を宿主とした発現系としては、多くの動物ウイルス遺伝子プロモーター及び動物細胞遺伝子プロモーターを用いた系が報告されている。前者の例としてアデノウイルス主要後期遺伝子プロモーター、B型肝炎ウイルス遺伝子プロモーター等が使用されている。また、後者の例としてはメタロチオネイン遺伝子プロモーター、インターフェロン遺伝子プロモーター、免疫グロブリン遺伝子プロモーター等が使用されている。また、選択マーカーとしては、ジエネティシン、メトレキセート、ハイグロマイシン等が主に用いられている。しかし、どの発現系を用いても生産性が充分ではない。そこで、更に効率のよい選択遺伝子を有する強力な高発現ベクターの開発が求められている。

### 【0004】

【発明が解決しようとする課題】 人体に投与する薬剤、例えばインターフェロン(IFN)は、現在、大腸菌を用いて大量に生産されているが、変性タンパク質の混入や糖鎖が付加されていない等の問題点がある。従って、動物細胞において有用タンパク質を大量発現させる系を構築することにより、かかる問題点を解決できるものと考えられる。

### 【0005】

【課題を解決するための手段】 そこで、本発明者は、動物細胞における外来遺伝子の高発現を目的として、特に有効な発現ベクターを開発するべく鋭意検討を試みたところ、極めて有効な発現ベクターを開発した。

【0006】 即ち、本発明の要旨は、薬剤耐性構造タンパク質遺伝子を選択遺伝子として含む発現ベクターに存する。なお、本発明でいう遺伝子とは、その遺伝子をもとにして生産されるメッセンジャーRNAをもとにして合成された相補DNA(cDNA)を含むものである。該発現ベクターはより好適には、所望タンパク質をコードする外来の遺伝子が強力なプロモーターのコントロール下に置かれており、その下流にはターミネーター配列を外来遺伝子発現用の制御配列として有し、これとユニットでタンデムに並んでいる同様のプロモーター及びターミネーター配列の間には、薬剤耐性構造タンパク質をコードする遺伝子配列を含み、このタンパク質の発現により薬剤耐性となり、さらには不完全チミジンキナーゼ(TK)遺伝子配列を有し、このタンパク質の発現によりHAT(ヒポキサンチン、アミノブテリン、チミジン)培地において選択されることを特徴とする発現ベクターである。

【0007】 本発明で用いられる薬剤耐性構造タンパク質の遺伝子は酵素活性を持たず、当該タンパク質の機能を阻害する薬剤のあるタンパク質の遺伝子であれば何でもよい。特に、アクチンやチューブリンのように細胞の

中に多量に存在するタンパク質の遺伝子が優れて有効であると考えられる。特に変異型ヒト $\beta$ -アクチン( $\beta'$ -アクチン)由来の遺伝子が好ましい。また、該薬剤はサイトカラシンBが、強力なプロモーターはSV40プロモーターが好ましい。本発明の好ましい態様としては、不完全チミジンキナーゼ(TK)遺伝子及びサイトカラシンB抵抗性の変異型 $\beta'$ -アクチンcDNAを有し、両者が発現することにより、HAT培地及びサイトカラシンBにより目的遺伝子の産物を大量に産生する形質転換細胞が選択されることを利用した、動物細胞中での大量発現に有効なプラスミドベクターである。

【0008】又、本発明は、前記発現ベクターを用い、このベクターのプロモーターアクション下流に外来構造遺伝子を組み込んだ組換えプラスミドにより、ヒトチミジンキナーゼ欠損細胞(TK-細胞)を形質転換することを特徴とする形質転換方法を含むものである。ヒトTK-細胞は、詳しくはKB細胞である。

【0009】更に又、本発明は、所望タンパク質をコードする外来構造遺伝子を発現させる方法において、前記の形質転換方法を用いて形質転換した細胞を培養することを特徴とする所望タンパク質の大量発現方法を含むものである。

【0010】以下に本発明について更に詳しく説明する。有用タンパク質であるインターフェロン(IFN)は、現在、大腸菌を用いて大量に生産されているが、糖鎖付加されない等の問題点がある。ヒトIFNはヒト細胞で生産するのが理想的である。不完全TK遺伝子を持つ細胞では、TK酵素タンパク質の合成量が少ないため、HAT培地中では不完全TK遺伝子を多数個持つ細胞が優先的に選択されることが期待される。もしそうであれば、同一DNA上に他の遺伝子を挿入しておれば、この遺伝子も増加した遺伝子の数に見合う発現をするはずである。

【0011】以上の考えに基づいて、本発明者は、不完全チミジンキナーゼ(TK)遺伝子を挿入した発現ベクターに変異型ヒト $\beta'$ アクチン遺伝子を組み込み、ヒトKB(TK-)細胞に移入したところ、大量の変異型ヒト $\beta'$ アクチンの発現を見た。アクチンのような構造タンパク質は細胞内に多量に存在し、かつその働き方は酵素のように触媒的ではなく化学量論的である。よって、新たに細胞に移入された薬剤耐性構造タンパク質が細胞に薬剤耐性を与えるためには、大量の耐性タンパク質の発現が必要とされる。

【0012】従って形質転換された細胞の中で、薬剤耐性構造タンパク質遺伝子のコピー数が多いものだけが選択されることになり、薬剤耐性構造タンパク質の遺伝子を発現ベクターの選択遺伝子として用いる方法は、今までにほんどの発現ベクターで用いられている酵素タンパク質遺伝子を選択遺伝子として用いる方法よりも有利であると考えられる。

【0013】そこで、不完全TK遺伝子と変異型ヒト $\beta'$ アクチン遺伝子の挿入された発現ベクターにさらにマウスIFN $\beta$ 遺伝子を組み込み、上と同様にヒトKB(TK-)細胞に移入し、HAT培地及びサイトカラシンBによる選択を行った。HAT培地によって不完全TK遺伝子のコピー数を多く持つ細胞が選択されることになり、さらに、変異型 $\beta'$ アクチンの発現した細胞はサイトカラシンBに対して耐性となるため、結果として、大量のマウスIFN $\beta$ を培養液中に分泌生産する形質転換細胞株を高頻度に得ることができた。

【0014】また、ヒトKB細胞は、HeLa細胞と同由来で、増殖能が優れた細胞であり、そのため培養も容易で増殖が早く、種々の培養法及び細胞培養液に対応でき、所望タンパク質の発現量も必然的に上昇するという利点がある。以下実施例により本発明を詳細かつ具体的に説明する。尚、下記の実施例は本発明を説明するものであり、本発明を限定するものではない。

#### 【0015】

##### 【実施例】

###### 実施例1：細胞培養

KB細胞株を、10%牛胎児血清及び60 $\mu$ g/mlカナマイシンを含むMEM(minimum essential medium)培地を用いて、37°Cにて~5 $\times$ 105 cells/mlになるまで一定速度で培養した。チミジンキナーゼ欠損株は、5-ブロモデオキシウリジンを用いた段階的な処理により分離した。

【0016】実施例2：垂直ゲルによる等電点電気泳動  
4.5%アクリルアミドゲルを用いた等電点電気泳動は、To yamaら(1988. J. Cell Biol. 107:1499-1504)の方法に従つたが、陰極の溶液は20mM NaOH、陽極の溶液は10mM H3P04とした。ゲルの染色にはSilver stain kit Wako(Wako Pure Chemical Industries)を用い、レーンのスキャニングにはデンシトメーター(Biomed Instruments, Inc.,)を使用した。その結果、変異型 $\beta'$ アクチンは $\beta$ アクチンに比べ、等電点がほぼ1単位の差で酸性側に移行していることがわかった。

###### 【0017】実施例3：アクチンの精製

上記条件により培養した親株、及び変異型 $\beta'$ アクチンを持つCyt1変異株を低回転数により集め、PBSで2度、更に0.1M Hepes, 0.1mM MgSO4, pH7.5の溶液で2度洗浄した。この細胞1gを2mlのbuffer G(3mM イミダゾール, 0.1mM CaCl2, 0.5mM ATP, 0.4 mM ジチオスレイトール, pH 7.5)に懸濁し、ホモジナイザーにて破碎する。アクチンの精製は、DEAE-セルロースを用いたクロマトグラフィーにより、Gordon et al. (1976. J. Biol. Chem. 251:4778-4786)の方法に従つた。変異型 $\beta'$ アクチンの精製は、ヒドロキシアパタイトを用いたクロマトグラフィーにより、Segura and Lindberg(1984. J. Biol. Chem. 259:3949-3954)の方法に従つた。

【0018】精製したアクチン(~10mg)は、5mM 酢酸カリウム, pH7.6, 0.5 mM DTT, 0.5 mM ATP, 0.1 mM CaCl2

溶液で予め平衡化したPD-10カラム(Pharmacia)を通して、5mM 酢酸カリウム、pH7.6, 1 mM DTT, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub> 溶液で予め平衡化したヒドロキシアバタイトカラム(1×14cm, Bio-Gel HTP; Bio-Rad Lab.)に添加する。このカラムに、80mlの5mM 酢酸カリウム、pH7.6, 0.5 mM DTT, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub> 溶液から40mM 酢酸カリウム、pH7.6, 1.5Mグリシン, 0.5 mM DTT, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub> 溶液へとグラジエントをかけて溶出を行う。流速を1.0ml/10min とし、予め50μl の10mM ATPのはいったチューブに1ml ずつ集められるよう設定した。変異型β' アクチン及びγアクチンピークのフラクションをAmicon YM-10 membrane(W. R. Grace & Co.)を用いて濃縮し、0.02% のアジ化ナトリウムを含むbuffer G により透析した。アクチンは氷上にて保存し、2週間に内に使用した。アクチンイソ体の純度は、SDS-ポリアクリルアミドゲルによる電気泳動で95%以上であった。変異株β' アクチンは、試験管内の重合反応でサイトカラシンBに抵抗性を持っていていた。

【0019】実施例4：変異型β' アクチンのクローニング及び塩基配列決定  
実施例3によって示された変異型β' アクチンの生産を指令するメッセンジャーRNA から相補DNA(cDNA)をクローニングすると共にダイデオキシ法により塩基配列を決定した。変異型β' アクチンcDNAの塩基配列は配列表に示す。

#### 【0020】

実施例5：エンハンサー/プロモーターの組合せの検討  
エンハンサー/プロモーター活性の強度と発現の関係について比較検討を行った。起源の異なる(SV40, サイトメガロウイルス, β-actin) エンハンサー/プロモーターを種々組み合わせてテストを行ったところ、SV40 エンハンサー/プロモーターの組み合わせが最もKB細胞におけるβ'-actin cDNAの発現に効率よく働くことが明かとなった。

#### 【0021】実施例6：不完全チミジンキナーゼ及びβ' アクチンcDNAを有する遺伝子発現ベクター(pTKSV β'-act1)の作成

基本的なベクターの作成方法については、Maniatisら(1982. Molecular Cloning. 545pp) の方法に従った。実施例3の結果に基づき、エンハンサー/プロモーターにはSV40のものを組み合わせて用いた。当該発現ベクターpTKSV β'-act1を構成する要素は次の通りである。①HSV (Herpes Simplex Virus)のチミジンキナーゼ遺伝子中のPvu II- Nco I 断片 (pTKSV β'-act1におけるBcl I - Cla I 部)。; ②pSV2neo のPst I - BamH I 断片 (pTKSV β'-act1におけるCla I-BamH I 部)。; ③pSV2hph のBamH I-Bgl II 断片 (pTKSV β'-act1におけるBamH I - Bgl II 部)。; ④β'-アクチンcDNAのMst I-EcoR I 断片 (pTKSV β'-act1におけるBgl II- Hind III 部)。; ⑤pSV2neo のHind III-Acc I 断片 (pTKSV β'-act1におけるHind III- Mlu I 部)。; ⑥pSV2neo のAcc

I - ApaLI断片 (pTKSV β'-act1におけるMlu I - ApaI I 部)。; ⑦pUC19 のApaL I - ApaL I 断片 (pTKSV β'-act1におけるApaL I - ApaL I 部)。; ⑧pSV2neo のApaI I-EcoR I 断片 (pTKSV β'-act1におけるApaL I - Bcl I 部)。

【0022】不完全チミジンキナーゼ遺伝子の作成については、2つのMlu I 認識部位に挟まれた断片を、Mlu I による処理を行うことにより排除し、その末端をKlenow fragment により平滑化し、T4 DNA ligaseにより結合させることにより行った。この操作により、エンハンサー及びプロモーター部は全く削除されないが、野生株の5' 非翻訳領域全部分及びチミジンキナーゼポリペプチドをコードする最初の10コドンが除かれた。このようにして得られたベクターを図1に示す。

#### 【0023】

##### 実施例7：プラスミドベクターpKAJ0 の作成

各種タンパク質をコードする遺伝子を挿入することで、どの様なタンパク質の大量発現にも応用できるプラスミドベクターpKAJ0 を作成した。これは、実施例5において作成した不完全チミジンキナーゼ遺伝子を有するベクターに、新たにSV40プロモーター/エンハンサーにはさまれたマルチクローニングサイトを加えるよう設計したものである。このようにして得られたベクターを図2に示す。

#### 【0024】実施例8：形質転換

形質転換に用いるスーパーコイルDNA は、Grahamら(1973. Virology. 52: 456-467)の方法に従って塩化カルシウム沈澱法により処理した。25cm<sup>2</sup> のフラスコに10μg のDNAを加え、16時間培養した後15%グリセロールを含むヘペスバッファー塩(20mM Hepes, 137mM NaCl, 2.7mM KCl, pH7.5)で3分間処理し、MEM培地にて20時間培養した。トリプシン-EDTA 処理にて細胞を集め、細胞数を測定した後、100mm ディッシュ中のHAT培地に約2×10<sup>6</sup> の細胞を再びまいた。培地交換は4日毎に行い、HAT培地に変えて16日目に2 μg/mlのサイトカラシンBを含むHT培地に交換した。5日以上が経過した時点で、2 μg/mlのサイトカラシンBを含むMEM培地に再び交換し直し、さらに5日間培養を続けた。単一集落はクローニングシリンダー中でクローニングした後大量に培養した。実施例5に従って調製した不完全TK遺伝子を含む発現ベクターにより形質転換される細胞の割合は、完全TK遺伝子で形質転換される細胞の割合より低く、遺伝子のコピー数の多い細胞が優先的に選択されていることが明かとなった。

【0025】実施例9：サイトカラシンB耐性の確認  
成長阻害因子であるサイトカラシンBに対する形質転換細胞の耐性を調べた。4ml のMEM培地を含む種々の濃度の薬剤にて、6-well multiwell plate (Falcon 3046) を用いて12日間37℃にてCO<sub>2</sub> インキュベーター中で培養した。細胞は1%メチレンブロードを含む50%エタノール

で染色した。まず、変異型  $\beta'$  アクチン発現ベクターである pTKSV  $\beta'$ -act1 により KB100TK- 細胞を形質転換させた。HAT 培地により TK+ である形質転換体を選択し、さらに 2  $\mu$ g/ml のサイトカラシン B を含む培地中で培養したところ、約 35% の TK+ 形質転換体が生存していた。この内 8 つの単一クローニングを大量に培養し、種々の濃度条件にあるサイトカラシン B 存在下にて生育能力を確かめるとともに変異型  $\beta'$  アクチンを定量した。その結果、等電点電気泳動において全クローニングから KB 細胞の変異型  $\beta'$  アクチンのバンドが検出されたが、クローニング毎にその強度に違いがみられた。その産生量は細胞の全タンパク質の 0.2 ~ 1 % を占めていた。また、サイトカラシン B に対する抵抗性と変異型  $\beta'$  アクチンの産生量との間には強い相関性があった。つまり、変異型  $\beta'$  アクチン遺伝子の大量発現が形質転換体にサイトカラシン B 耐性能を付与していた。

【0026】実施例 10：マウス IFN  $\beta$  の生産  
上記実施例において作成された、不完全チミジンキナーゼ遺伝子及び変異型  $\beta$  アクチン遺伝子を有する発現ベクターに、マウス IFN  $\beta$  遺伝子を組み込み、大量生産を試みた。具体的な操作方法は実施例 7 に従ったが、SV40 エンハンサー／プロモーターにはさまれたマルチクローニングサイト部位にマウス IFN  $\beta$  遺伝子を挿入した pTKSV  $\beta'$ -act1(pTYmIFN-  $\beta$ ) 10  $\mu$ g を、ヒト KB 細胞

#### 配列

```

GAATTGGCA CGAGCGCGTC CGCCCCGCGA GCACAGAGCC TCGCCTTGCG CGATCCGCCG 60
1 5
CCCGTCCACA CCCGCCGCCA GCTCACC ATG GAT GAT GAT ATC GCC GCG CTC 111
Met Asp Asp Asp Ile Ala Ala Leu

10 15 20
GTC GTC GAC AAC GGC TCC GGC ATG TGC AAG GCC GGC TTC GCG GGC GAC 159
Val Val Asp Asn Gly Ser Gly Met Cys Lys Ala Gly Phe Ala Gly Asp
25 30 35 40
GAT GCC CCC CGG GCC GTC TTC CCC TCC ATC GTG GGG CGC CCC AGG CAC 207
Asp Ala Pro Arg Ala Val Phe Pro Ser Ile Val Gly Arg Pro Arg His

45 50 55
CAG GGC GTG ATG GTG GGC ATG GGT CAG AAG GAT TCC TAT GTG GGC GAC 255
Gln Gly Val Met Val Gly Met Gly Gln Lys Asp Ser Tyr Val Gly Asp

60 65 70
GAG GCC CAG AGC AAG AGA GGC ATC CTC ACC CTG AAG TAC CCC ATC GAG 303
Glu Ala Gln Ser Lys Arg Gly Ile Leu Thr Leu Lys Tyr Pro Ile Glu

75 80 85
CAC GGC ATC GTC ACC AAC TGG GAC GAC ATG GAG AAA ATC TGG CAC CAC 351
His Gly Ile Val Thr Asn Trp Asp Asp Met Glu Lys Ile Trp His His
90 95 100
ACC TTC TAC AAT GAG CTG CGT GTG GCT CCC GAG GAG CAC CCC GTG CTG 399

```

にリン酸カルシウム法によりトランスフェクトさせ、これを 4  $\times$  106 cells/ml になるまで培養し、HAT 培地にて選択したところ 115 の細胞を得た。さらに、終濃度 2  $\mu$ g/ml のサイトカラシン B で選択したところ、61 の細胞を得た。発現された IFN の活性は、IFN に誘導される 2-5A 合成酵素の活性により測定した。その結果、抗ウイルス活性に換算して最高 2  $\times$  107 u/ml の活性が測定され、これは現在までに報告されている他の系を用いた場合に比べ約 10~100 倍の効果であると認められた。

#### 【0027】

【発明の効果】以上述べたごとく本発明によれば、動物細胞を宿主として有用タンパク質を大量に発現させる方法を確立した。

#### 【0028】

##### 【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：1128

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

核酸の種類：cDNA

起源

生物名：Homo sapiens

Thr Phe Tyr Asn Glu Leu Arg Val Ala Pro Glu Glu His Pro Val Leu  
 105 110 115 120  
 CTG ACC GAG GCC CCC CTG AAC CCC AAG GCC AAC CGC GAG AAG ATG ACC 447  
 Leu Thr Glu Ala Pro Leu Asn Pro Lys Ala Asn Arg Glu Lys Met Thr  
 125 130 135  
 CAG ATC ATG TTT GAG ACC TTC AAC ACC CCA GCC ATG TAC GTT GCT ATC 495  
 Gln Ile Met Phe Glu Thr Phe Asn Thr Pro Ala Met Tyr Val Ala Ile  
 140 145 150  
 CAG GCT ATG CTA TCC CTG TAC GCC TCT GGC CGT ACC ACT GGC ATC GTG 543  
 Gln Ala Met Leu Ser Leu Tyr Ala Ser Gly Arg Thr Thr Gly Ile Val  
 155 160 165  
 ATG GAC TCC GGT GAC GGG GTC ACC CAC ACT GTG CCC ATC TAC GAG GGG 591  
 Met Asp Ser Gly Asp Gly Val Thr His Thr Val Pro Ile Tyr Glu Gly  
 170 175 180  
 TAT GCC CTC CCC CAT GCC ATC CTG CGT CTG GAC CTG GCT GGC CCG GAC 639  
 Tyr Ala Leu Pro His Ala Ile Leu Arg Leu Asp Leu Ala Gly Arg Asp  
 185 190 195 200  
 CTG ACT GAC TAC CTC ATG AAG ATC CTC ACC GAG CGC GGC TAC AGC TTC 687  
 Leu Thr Asp Tyr Leu Met Lys Ile Leu Thr Glu Arg Gly Tyr Ser Phe  
 205 210 215  
 ACC ACC ACG GCC GAG CGG GAA ATC GTG CGT GAC ATT AAG GAG AAG CTG 735  
 Thr Thr Ala Glu Arg Ile Val Arg Asp Ile Lys Glu Lys Leu  
 220 225 230  
 TGC TAC GTC GCC CTG GAC TTC GAG CAA GAG ATG GCC ACG GCT GCT TCC 783  
 Cys Tyr Val Ala Leu Asp Phe Glu Gln Glu Met Ala Thr Ala Ala Ser  
 235 240 245  
 AGC TCC TCC CTG GAG AAG AGC TAC GAG CTG CCT GAC GGC CAG GTC ATC 831  
 Ser Ser Ser Leu Glu Lys Ser Tyr Glu Leu Pro Asp Gly Gln Val Ile  
 250 255 260  
 ACC ATT GGC AAT GAG CGG TTC CGC TGC CCT GAG GCA CTC TTC CAG CCT 879  
 Thr Ile Gly Asn Glu Arg Phe Arg Cys Pro Glu Ala Leu Phe Gln Pro  
 265 270 275 280  
 TCC TTC CTG GGC ATG GAG TCC TGT GGC ATC CAC GAA ACT ACC TTC AAC 927  
 Ser Phe Leu Gly Met Glu Ser Cys Gly Ile His Glu Thr Thr Phe Asn  
 285 290 295  
 TCC ATC ATG AAG TGT GAC GTG GAC ATC CGC AAA GAC CTG TAC GAC AAC 975  
 Ser Ile Met Lys Cys Asp Val Asp Ile Arg Lys Asp Leu Tyr Asp Asn  
 300 305 310  
 ACA CTG CTG TCT GGC GGC ACC ACC ATG TAC CCT GGC ATT GCC GAC AGG 1023  
 Thr Val Leu Ser Gly Gly Thr Thr Met Tyr Pro Gly Ile Ala Asp Arg  
 315 320 325  
 ATG CAG AAG GAG ATC ACT GCC CTG GCA CCC AGC ACA ATG AAG ATC AAG 1071  
 Met Gln Lys Glu Ile Thr Ala Leu Ala Pro Ser Thr Met Lys Ile Lys  
 330 335 340  
 ATC ATT GCT CCT CCT GAG CGC AAG TAC TCC GTG TGG ATC GGC GGC TCC 1119  
 Ile Ile Ala Pro Pro Glu Arg Lys Tyr Ser Val Trp Ile Gly Gly Ser

345 350 355 360  
 ATC CTG GCC TCG CTG TCC ACC TTC CAG CAG ATG TGG ATC AGC AAG CAG 1167  
 Ile Leu Ala Ser Leu Ser Thr Phe Gln Gln Met Trp Ile Ser Lys Gln  
 365 370 375  
 GAG TAT GAC GAG TCC GGC CCC TCC ATC GTC CAC CGC AAA TGC TTC TAG 1215  
 Glu Tyr Asp Glu Ser Gly Pro Ser Ile Val His Arg Lys Cys Phe \*\*\*  
 GCGGACTATG ACTTAGTTGC GTTACACCCCT TTCTTGACAA AACCTAACTT GCGCA 1270

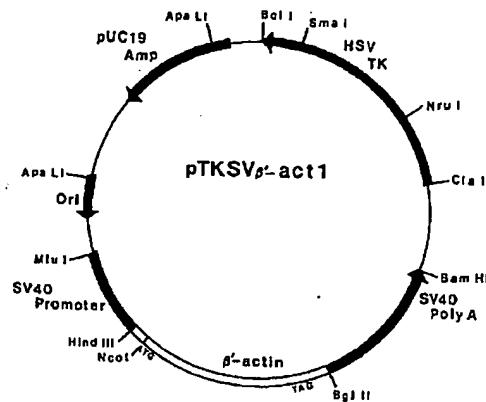
【図面の簡単な説明】

【図1】遺伝子発現ベクター (pTKSV  $\beta'$ -act1) の構成  
を示す模式図である。

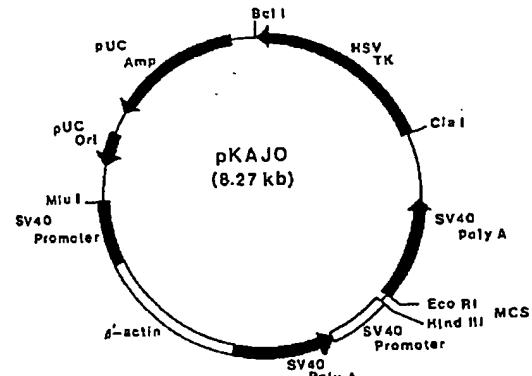
【図2】プラスミドベクターpKAJO の構成を示す模式図

である。

【図1】



【図2】



フロントページの続き

| (51) Int. Cl. 5  | 識別記号 | 府内整理番号    | F I | 技術表示箇所 |
|------------------|------|-----------|-----|--------|
| C 1 2 N 15/22    |      |           |     |        |
| C 1 2 P 21/02    |      | C 8214-4B |     |        |
| // A 6 1 K 37/66 |      | B 8314-4C |     |        |
| (C 1 2 N 5/10    |      |           |     |        |
| C 1 2 R 1:91)    |      |           |     |        |
| (C 1 2 P 21/02   |      |           |     |        |
| C 1 2 R 1:91)    |      |           |     |        |

## MANIFESTATION VECTOR USING DRUG-RESISTANT STRUCTURE PROTEIN GENE AS SELECTOR GENE

Patent Number: JP6038773

Publication date: 1994-02-15

Inventor(s): TOMIYAMA SAKUJI; others: 03

Applicant(s): TOYOB0 CO LTD

Requested Patent:  JP6038773

Application Number: JP19920045939 19920131

Priority Number(s):

IPC Classification: C12N15/85; C12N5/10; C12N15/12; C12N15/22; C12P21/02

EC Classification:

Equivalents:

### Abstract

PURPOSE: To enable the expression of a large amount of useful protein by using an animal cell as a host.

CONSTITUTION: The objective manifestation vector contains an exogenote coding a desired protein under the control of a strong promoter, has a terminator sequence and a control sequence for the expression of the exogenote at the downstream of the exogenote, contains a gene sequence coding a drug-resistant structure protein between a similar sequence and the terminator sequence arranged in tandem to form a unit and has an incomplete thymidine kinase gene sequence.

Data supplied from the esp@cenet database - I2